

# 中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE  
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS  
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，  
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this  
office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2002 年 10 月 25 日  
Application Date

申請案號：091125320  
Application No.

申請人：國立成功大學  
Applicant(s)

局長  
Director General

蔡練生

發文日期：西元 2003 年 7 月 10 日  
Issue Date

發文字號：09220697360  
Serial No.

80749

申請日期	
案 號	
類 別	

A4  
C4

(以上各欄由本局填註)

# 發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	於蘭花中控制花發育之基因
	英 文	GENES CONTROLLING FLORAL DEVELOPMENT IN ORCHID
二、發明 創作人	姓 名	1.陳虹樺 CHEN, HONG-HWA 2.蔡文杰 WEN-CHIEH TSAI
	國 籍	均中華民國 R.O.C.
	住、居所	1.台南市莊敬路9號3樓之2 2.嘉義縣鹿草鄉竹山村99號之7
三、申請人	姓 名 (名 稱)	國立成功大學 NATIONAL CHENG KUNG UNIVERSITY
	國 籍	中華民國 R.O.C.
	住、居所 (事務所)	台南市大學路1號 NO. 1, UNIVERSITY ROAD, TAINAN CITY, TAIWAN, ROC.
	代 表 人 姓 名	高 強

四、中文發明摘要(發明之名稱： 於蘭花中控制花發育之基因 )

本發明主要關於一種核酸分子，其可於蘭花中控制花發育，該核酸分子之序列係選自由 *PeMADS2*、*PeMADS3*、*PeMADS4*、*PeMADS5*、其反轉錄股及其簡併序列所組成之群；其中 *PeMADS2* 係用於控制花萼之發育；*PeMADS3* 係用於控制唇瓣之發育；*PeMADS4* 係用於控制唇瓣及蕊柱之發育；*PeMADS5* 係用於控制花瓣及雄蕊之發育。本發明亦關於一種於蘭花中控制花發育之方法及一種製造轉殖植物之方法。

英文發明摘要(發明之名稱： GENES CONTROLLING FLORAL DEVELOPMENT IN ORCHID )

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權

本案在向中華民國申請專利前，未曾向其他國家申請專利。

有關微生物已寄存於：

寄存日期：

，寄存號碼：

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 1 )

### 發明領域

本發明係關於一種於蘭花中控制花發育之基因，詳言之，係關於控制花萼、花瓣、唇瓣、蕊柱及雄蕊發育之基因。

### 發明背景

蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis spp.*) 屬於單莖軸蘭科植物，其優雅的花型特徵深受國人喜愛，是台灣最具外銷競爭潛力的花卉之一，其中具有特殊花型之蝴蝶蘭常常成為花卉市場上之珍品而具有極高之經濟價值。

一般的單子葉及雙子葉植物，其花型為不同型態的器官輪生，其中最外層為花萼、其次為花瓣、再其次為雄蕊、而最內層為雌性生殖器官。在現代的分子育種學中，依據對控制花型發育的調控機制及其相關基因之瞭解，藉由改變控制花型發育之基因表現，可培養出具有特殊花型之植物。在模式植物如阿拉伯芥及金魚草中，對於控制植物花型發育決定之基因及其作用機制，已有深入的研究 (Weigel, D., 及 Meyerowitz, E. M. (1994). The ABCs of floral homeotic genes. Cell 78, 203-209)；在這些模式植物中，花型的控制機制為「ABC模式 (ABC model)」，藉由三種控制花型之基因A、B及C單獨或組合表現，而控制花型器官之發育，其中A基因單獨表現可控制花萼的發育；AB基因組合表現可控制花瓣的發育；BC基因組合表現可控制雄蕊的發育；及C基因單獨表現可控制雌蕊的發育 (Theissen, G. 等人 (2000). A short

## 五、發明說明 ( 2 )

history of MADS-box genes in plants. Plant Mol. Biol. 42, 115-149)。

這些 A、B 及 C 基因皆為編碼轉錄因子(transcription factor)之基因，且其基因產物之序列皆具有「MIKC型區域結構(MIKC-type domain structure)」，其包含 MADS-box(M)區域、介中(intervening, I)區域、類角蛋白(keratin-like, K)區域及C端(C-terminal, C)區域，其中MADS-box區域在阿拉伯芥及金魚草中被認為在控制花型發育時扮演重要的角色(Weigel及Meyerowitz, 1994)。

所有具有B基因功能的基因都具有MADS-box區域，且這些B基因又可分為類DEF及類GLO基因兩類(Theissen, G. 等人(1996). Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. J. Mol. Evol. 43, 484-516)。目前只有一種類DEF基因在單子葉植物中如岷江百合 (*Lilium regale*)、小麥(*Triticum aestivum*)、玉米及水稻中被研究出(Münster, T. 等人(2001). Characterization of three GLOBOSA-like MADS-box genes from maize: evidence for ancient paralogy in one class of floral homeotic B-function genes of grasses. Gene 262, 1-13)。

然而蝴蝶蘭並不符合一般單子葉及雙子葉植物之花型，

## 五、發明說明 ( 3 )

而具有三片花萼、二片花瓣、一片唇瓣及由雄蕊與雌蕊癒合的蕊柱構造，其花粉則黏結形成位於花藥內蕊柱上端之花粉塊(pollinia)(參看圖1a)，使得目前在模式植物上之研究結果，並無法充分解釋造成蝴蝶蘭特殊優雅花型之原因。故於習知技藝中，若欲改變蝴蝶蘭花的花型，通常採用的仍是傳統的育種方法，不但費時甚久，且通常難以達到所欲之結果。

### 發明概述

本發明乃致力於研究於蘭花中控制花發育之基因，以俾利用分子育種方法改變蘭花之花型。本發明研究出四種可於蘭花中控制花發育之基因，其皆具有ABC模式中B基因之功能並屬於類DEF基因，且其基因產物皆具有MIKC型區域結構。

本發明之目的在於提供一種核酸分子，其可於蘭花中控制花發育，該核酸分子之序列係選自由 *PeMADS2*、*PeMADS3*、*PeMADS4*、*PeMADS5*、其反轉錄股及其簡併序列所組成之群；其中 *PeMADS2* 係用於控制花萼之發育；*PeMADS3* 係用於控制唇瓣之發育；*PeMADS4* 係用於控制唇瓣及蕊柱之發育；*PeMADS5* 係用於控制花瓣及雄蕊之發育。

根據本發明，亦提供包含可於蘭花中控制花發育之核酸分子之載體、細胞、擬原球體及套組，本發明同時提供可於蘭花中控制花發育之蛋白質。

本發明之另一目的在於提供一種製造蘭科轉殖植物之方

## 五、發明說明 ( 4 )

法，其係導引可於蘭花中控制花發育之核酸分子至一蘭科植物細胞中，並由該植物細胞再生製造該轉殖植物。

本發明之又一目的在於提供一種製造蘭科植物轉型細胞之方法，其係將可於蘭花中控制花發育之核酸分子導引至一蘭科植物細胞中，以獲得該植物轉型細胞。

本發明之再一目的在於提供一種於蘭花中控制花發育之方法，其係改變一蘭科植物體內可於蘭花中控制花發育之蛋白質表現量，以控制花發育。

### 圖式簡要說明

圖 1a 表示野生種之桃紅蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis equestris*) 花型；圖 1b 表示突變種之桃紅蝴蝶蘭花型；及圖 1c 表示花苞發育之時期。

圖 2 表示 PeMADS 蛋白質與類 *GLO* 及類 *DEF* 基因產物之序列比對分析圖。此比對分析圖係由電腦程式 PILEUP 分析，並以 PRETTYBOX 顯示，其中相同序列之部分以黑色框反白字標示；類似序列之部分以灰色框標示；不同序列之部分以白色框黑色字標示；缺口之部分以點標示；及無胺基酸殘基之部分則以「~」標示。圖中「MADS-DOMAIN」表示 MADS 區域；「I-DOMAIN」表示介中區域；「K-DOMAIN」表示類角蛋白區域；及「C-DOMAIN」表示 C 端區域。用於比較之 OSMADS4 及 OSMADS16 為來自水稻；SILKY1 為來自玉米；LMADS1 為來自百合；DEF 為來自金魚草；PI 及 AP3 為來自阿拉伯芥；且 PeMADS2, PeMADS3, PeMADS4, 及



## 五、發明說明 ( 5 )

PeMADS5則來自桃紅蝴蝶蘭。

圖3表示PI衍生區位(PI-derived motif)及paleoAP3區位之序列比較分析圖，其中PeMADS2、PeMADS3、PeMADS4及PeMADS5為來自桃紅蝴蝶蘭；OSMADS16為來自水稻；SILKY1為來自玉米；TDR6為來自*L. esculentum*；TAMADS51為來自小麥(*T. aestivum*)；SmAP3為來自蒙特登慈姑(*S. montevidensis*)；PnAP3-2為來自冰島罌粟(*P. nudicaule*)；MfAP3為來自*M. figo*；DeAP3為來自*D. eximia*；CMB2為來自康乃馨(*D. caryophyllus*)；LMADS1為來自鐵砲百合(*L. longiflorum*)。

圖4表示B基因之MADS-box基因家族中，*DEF*、*GLO*及*GGM2*次家族之演化樹圖。此演化分析係採鄰近參與演算法(neighbor-joining algorithm)進行，以B基因蛋白質的旁支系GMM13(Becker, A. 等人(2000). MADS-box gene diversity in seed plants 300 million years ago. Mol. Biol. Evol. 17, 1425-1434)為演化樹之根，圖中亦於主要的結點上指出自1000個複製(replicates)之啟動值(bootstrap values)，蛋白質名稱後括號中之種名為最具代表性者。

圖5表示桃紅蝴蝶蘭中*PeMADS*基因的南方墨點分析圖。其中DNA凝膠墨點包含分別以*Bgl* II (第1、4、7、10行)、*Eco* RI (第2、5、8、11)及*Hind* III (第3、6、9、12行)處理之10  $\mu$ g基因體DNA，並於嚴格之狀態下，與

## 五、發明說明 ( 6 )

*PeMADS* 基因之3'端特異區域探針雜合。圖中之基因名標示於上方，而DNA之分子長度標記(kb)則標示於左方。

圖6表示*PeMADS*基因於不同之花苞發育時期及於不同蘭花組織中之表現圖。圖中之基因名標示於左。行一至四中，每一行包含時期I至時期IV花苞之10  $\mu$ g全部RNA；行五為花梗；行六為苗芽(shoots)；行七為葉；及行八為根。以獨特的探針進行北方墨點分析雜交，且每一行皆以28S核糖體RNA代表全部RNA之量。

圖7表示*PeMADS*基因在花的不同器官中之北方墨點分析結果，其中圖7a表示野生種；圖7b表示突變種。RNA的來源分別為：行一及行六為花萼(Se)；行二及行七為花瓣(Pe)；行三及行八為唇瓣(Li)；行四為花粉塊(Po)；及行五及行九為蕊柱(Co)。圖中之基因名標示於左，每一墨點包含自成熟花器官萃取而得之全部RNA，且每一行皆以28S核糖體RNA代表全部RNA之量。

### 發明詳細說明

本發明主要係關於一種核酸分子，其可於蘭花中控制花發育，該核酸分子之序列係選自由*PeMADS2*、*PeMADS3*、*PeMADS4*、*PeMADS5*、其反轉錄股及其簡併序列所組成之群，可藉著改變這些核酸分子及其蛋白質產物於蘭花中之量，而改變花型；其中

*PeMADS2*之序列為：

```
ACGCGGGATA GTAGAGGAAG AAGAAGAGAA GGGTTGAGAA CAGAGGAAAA CAGGGGAGAA
CAGGGGAAGA GAGAGATGGG GAGGGGGAAG ATAGAGATAA AAAAGATAGA GAATCCGACG
AACAGGCAAG TTACATATTC TAAGAGGAGA GTTGGGATAC TGAAGAAGGC CAAGGAGCTC
ACTGTTCTCT GTGATGCTCA GGTCTCTCTC ATCATGTTCT CAAGCACAGG AAAGTTGGCT
GATTACTGCA GCCCCTCTAC TGATATTAAG GGGATATATG AGAGGTACCA GGTGTGACT
```

## 五、發明說明 ( 7 )

GGAATGGATC TATGGAATGC TCAGTATGAG AGGATGCAGA ATACGCTGAA GCATCTGAAT  
GAGATTAACC AAAACCTGAG GAAGGAGATT AGGAGGAGGA AGGGGGAGGA ATTGGAGGGC  
ATGGACATAA AGCAACTGCG CGGTCTTGAG CAAACTTTGG AAGAGTCTCT TAGAATTGTT  
AGGCATAGAA AGTATCATGT GATCGCCACA CAAACTGACA CTTACAAGAA AAAGCTTAAA  
AGCACAAAGG AACTTACCG CGCTCTAATA CATGAACTGG ATATGAAAGA GGAGAATCCG  
AACTACGGTT TTAATGTAGA AAACCAGAGT AGAATTTATG AAAATTCGAT TCCAATGGTG  
AATGAGTGTC CTCAGATGTT TTCCTTTAGG GTTGTTTCATC CGAATCAGCC CAATCTGCTT  
GGTTTAGGTT ATGAATCACA TGATCTTAGC CTTGCATAAT GAGCAGTAAT ATTATGATTT  
TATTGTATTT TTATTTTATG TTTGAACTT TAGAATTATG AGATGGGGGA TCTATTCAGA  
GAGAACTGTC CTTTAATTTG ATTTTCCCGT TTGTTTCTC TTCATGTCCA GTGAAATTTT  
TTGTTTTGTT TTTTCGG

*PeMADS3* 之序列為：

ACGCCACAAC CCTTTGGCCA TTGCCTGCTA ATGGAAACCC AGCTGCCACT TTTTCCTTCC  
CCAGCCTTAT ATACCTTCAG TTACTCTCTT CTGCCTCCAT TTTTATAAGC ATACTTTTRCC  
CCTTTTCTTT CCCATATCAA TCTCAACTCC TTCGCTTCTC CTGCTGCTTT GGGAAAGCAGA  
GCAAGAAAGA GAACCATGGG GAGGGGGAAG ATCGAGATAA AGAAGATTGA GAACCCCTACA  
AACAGGCAGG TTACTTACTC TAAGAGGAGG GCTGGGATCA TGAAAAAGCG GAGCGAGCTC  
ACGGTTCTCT GTGATGCTCA GCTCTCCCTT GTTATGTTCT CCAGCACCGG CAAGTTCTCC  
GAGTATTGTA GTCCTACCAC CGATACCAAG AGTGTATATG ATCGTTACCA GCAGGTGTCC  
GGCATAAATT TATGGAGCGA GCAGTACGAG AAGATGCAGA ATACGTTGAA TCATTTGAAG  
GAGATAAACC ACAACTTGAG GAGGGAGATA AGGCAGAGGA TGGGCGAGGA TCTTGAAGGG  
CTAGAAATCA AAGAACTGCG TGGTCTTGAG CAAAATATGG ACGAGGCCCT AAAGCTTGTA  
AGGAATCGAA AGTATCACGT CATCAGCACC CAGACAGATA CATTCAAAAA AAAGTTGAAA  
AACTCTCAAG AAACCCACAG GAACTTACTC CGGGAGCTGG AAAGTGAAG CAAGTTGAAA  
TACGTGGATG ATGATCCAAA CAACTATGAT GGCGCGCTTG CACTTGGAAG TGGGGCTTCC  
TACTTGTATT CATTTTCGTAC CCAACCAAGC CAGCCGAACC TTCAGGGAGT TGGATATGTC  
CCTCATGATC TACGTCTCGC CTGATCTTTT ATTATCTGCA TGCCAACTGC TTAATTATAT  
CTATGTATCT GATGTTCTTA CGCTTACAAG TAGGGTCTAG CACTGCAATC GAATTCCCGC  
GGCCGCCAGC GGCCGGACTC

*PeMADS4* 之序列為：

ACGCGGGGCA CTGGCTTCAC TTTCTTCCCT GCGGCAATGG CCAACTATTC CCGGTAACCTA  
TCGCTTTTGC GTTTCCAGTT CTATAAAGG AATCCCCGCC AGAGCTTTTT CTTCTTATAG  
AGCTTTCTTC CTCATCTCTC CCGTTCGTCA ACATCACTAA TCACTGCTGT TTCAGTAGAC  
TGGGAGAGCT AGGAGTGGAG AAAAGAGATT TGAAGATGGG GAGGGGGAAG ATAGAGATTA  
AGAAGATAGA GAATCCGACT AATCGGCAGG TGACCTACTC GAAGAGGAGA GCTGGGATTA  
TGAAGAAGGC GAGGAGATC ACTGTTCTCT CCGATGCTGA GGTTCGCTT ATCATGTTCT  
CGAGTACTGG GAAGTTTTCT GAGTACTGTA GCCCTTCGAC GGAAACGAAG AAGGTTTTTG  
AACGCTACCA GCAGGTATCT GGCATTAAC TGTGGAGCTC GCAGTACGAG AAGATGCTGA  
ATACGCTTAA CCATTGGAAG GAGATCAATC GCAATCTGAG GAGGGAAGTA AGGCAGAGGA  
TGGGGGAAGA TCTTGAGGGA CTGGATATCA AGGAACTGCG CGGTCTTGAG CAAAACATTG  
ATGAGGCATT GAAGCTAGTA CGAAATAGAA AATATCATGT AATCAGTACT CAAACGGACA  
CCTACAAGAA GAAGTTGAAG AACTCCCAAG AAACACACCG GAACCTAATG CACGAATTGG  
AAATCGTTGA GGACCACCA GTGTATGGGT TCCACGAGGA TTCAAGCAAT TATGAGGGTG  
TTCTTGCTCT TGCAAATGAC GGGTCTCACA TGTATGCCTT CCGGGTGCAA CCCAACCAAC  
AAAATCTTCA AGGAACGGGA TATAGCTCTC ACGATCTTCG CCTCGCTTGA TATAATCGTG  
TAAGTAGTAC AATCACATAT GCAGTCTTCA TTTTATTGTT CGCAAATTAT GCTCTCAGTA  
GCTGGTATCT AATGTAGAAC TAACTACTGC AACTTGCTCT TATCTTGCTA TGTGTGATTC  
TGTGGTAATG TGGACT

*PeMADS5* 之序列為：

TCGCAACACG AGGCGCTGTC GGCGAGTCGG GTTGTGTTGG AATGCAGCCC TAATCGGGCG  
GTAAATTCCG TCCAAGGCTA AATACGGGCG AGAGACCGAT AGCGAACAAG TACCGCGAGG  
GAATGGGGAG AGGGAAGATA GAGATAAAGA AGATAGAGAA TCCAACAAGC AGGCAAGTAA  
CGTATTCAAA GAGGCGACTT GGGATCATGA AGAAGGCAGA GGAACCTACA GTGCTCTGCG

## 五、發明說明 ( 8 )

```

ACGCTCAACT CTCACATC ATCTTCTCAA GCTCCGGCAA GTTAGCTGAT TTCTGCAGCC
CTTCCACAGA CGTTAAAGAT ATAGTTGAGA GGTACCAAAA TGTTACCGGA ATTGATATAT
GGGATGCGCA ATATCAGAGG ATGCAGAACA CTCTGAGGAA TCTCAGGGAG ATTAATCGTA
ATCTTCAGAA GGAGATAAGA CAGAGGAAGG GGGAGAATCT GGAAGGGTTG GGCGTTAAAG
AGCTGCGCGG TCTTGAGCAA AAATTGGAGG AGTCGGTTAA GATTGTTCGG CAGAGAAAAGT
ATCATGTGAT CGCTACGCAA ACAGACACTT GCAGGAAAAA GCTCAAAAAGC AGCAGACAAA
TATACAGAGC CCTAACGCAT GAACTGCAGA AGCTGGACGA AGAGAATCAA CCGTGACGTT
TTCTCGTAGA AGATCTAAGC TGCATCTATG ACAGCTCAAT CTCAATGGCA AATCGGCTGC
ACCGGAGTGA GCCAAATGTG CAGAAAAGTAG TTCGTGAGTG TCATGAGTTT GGCTTTGATT
GACCTGCAAT TTTCTATTAC TTTGTGTTAC AATGTGGATT TGTTTTCATG GCTTAACATC
ATAGGATTGT ATAACTATT TTTTGTGTG CAATGTTTAA GTTCTGATCT TGATATCC

```

根據本發明，其係於桃紅蝴蝶蘭花苞之cDNA資料庫中，獲得四個類DEF基因之表現序列標幟(expressed sequence tags)，並從而取得全段基因，分別命名為PeMADS2、PeMADS3、PeMADS4及PeMADS5；其中PeMADS2編碼一227胺基酸長的蛋白質PeMADS2；PeMADS3編碼一222胺基酸長的蛋白質PeMADS3；PeMADS4編碼一224胺基酸長的蛋白質PeMADS4；及PeMADS5編碼一219胺基酸長的蛋白質PeMADS5，其中PeMADS2、PeMADS3、PeMADS4及PeMADS5之胺基酸序列如下所示：

## PeMADS2：

```

1   MGRGKIEIKK IENPTNRQVT YSKRRVGILK KAKELTVLCD AQVSLIMFSS
51  TGKLADYCSP STDIKGIYER YQVVTGMDLW NAQYERMONT LKHLNEINQN
101 LRKEIRRRXG EELEGMDIKQ LRGLEQTLEE SLRIVRHRKY HVIATQTDY
151 KKKLKSTRET YRALIHELDM KEENPNYGFN VENQSRIYEN SIPMVNECPQ
201 MFSFRVVHPN QPNLLGLGYE SHDLSLA

```

## PeMADS3：

```

1   MGRGKIEIKK IENPTNRQVT YSKRRAGIMK KASELTVLCD AQLSLVMFSS
51  TGKFSEYCSP TTDTKSVYDR YQQVSGINLW SEQYEKMONT LNHLKEINHN
101 LRREIRQRMG EDLEGLEIKE LRGLEQNMDE ALKLVRNRKY HVIATQTDY
151 KKKLKNSQET HRNLLRELET EHAVYYVDDD PNNYDGALAL GNGASYLYSF
201 RTQPSQPNLQ GVGYPHDLR LA

```

## PeMADS4：

```

1   MGRGKIEIKK IENPTNRQVT YSKRRAGIMK KAREITVLCD AEVSLIMFSS
51  TGKFSEYCSP STETKKVFER YQQVSGINLW SSQYEKMLNT LNHSKEINRN
101 LRREVRQRMG EDLEGLDIKE LRGLEQNIDE ALKLVRNRKY HVIATQTDY
151 KKKLKNSQET HRNLMHELEI VEDHPVYGFH EDSSNYEGVL ALANDGSHMY
201 AFRVQPNQQN LQGTGYSSHD LRLA

```

## 五、發明說明 ( 9 )

## PeMADS5 :

```
1   MGRGKIEIKK IENPTSQVT YSKRRLGIMK KAEELTVLCD AQLSLIIFSS
51  SGKLAFCSP STDVKDIVER YQNVGTGIDIW DAQYQRMQNT LRNLREINRN
101 LQKEIRQRKG ENLEGLGVKE LRGLEQKLEE SVKIVRQRKY HVIATQTDTC
151 RKKLKSSRQI YRALTHELQK LDEENQPCSF LVEDLSICIYD SSISMANRLH
201 RSEPNVQKVV RECHEFGFD
```

參看圖2，PeMADS2、PeMADS3、PeMADS4及PeMADS5蛋白質經分析後皆具有獨特的MIKC型區域結構，其中位於PeMADS蛋白質第1至57胺基酸之MADS區域具有相當高之相似性(86至96%)；位於PeMADS蛋白質第58至76胺基酸為介中區域，其中PeMADS2、PeMADS3、PeMADS4在相應位置(83至87)都具有AP3之高度保留區域，其序列為：(H/Q)YEXM，而PeMADS5則為QYQRM；PeMADS蛋白質第77至151胺基酸為類角蛋白區域；位於PeMADS蛋白質第152至最後胺基酸為C端區域，參看圖3，其中PeMADS2、PeMADS3、PeMADS4同時具有超過60%相似性之PI衍生區位(PI-derived motif, FXFRLOPSQPNLH, Moon, Y.-H. 等人(1999). Identification of a rice *APETALA3* homologue by yeast two-hybrid screening. Plant Mol. Biol. 40, 167-177)及paleoAP3區位(paleoAP3 motif, YGXHDLRLA)，但PeMADS5則未見明顯之相似性，除此兩區位外，C端區域彼此之間有較大之差異，此可證明於蘭科中確實存在四個類DEF基因，而非實驗操作上之誤差，在百合、水稻及玉米中，則只具有單一類DEF之MADS基因。

PeMADS2、PeMADS3、PeMADS4及PeMADS5與其

## 五、發明說明 ( 10 )

他MADS-box基因產物演化分析的結果顯示(參看圖4)，此四蛋白質皆屬於單子葉之B基因中之類DEF蛋白質，其中*PeMADS2/PeMADS5*及*PeMADS3/PeMADS4*應分別演化自兩同源之蛋白質，再經基因複製(gene duplication)產生四個基因。另以C端區域作為探針，可知*PeMADS2*、*PeMADS4*及*PeMADS5*於桃紅蝴蝶蘭之基因體中各具有一單一複本，而*PeMADS3*則具有兩個複本(參看圖5)。

在蘭科的花發育時，通常可分為四個時期(參看圖1c)：時期I：花苞長0至1mm；時期II：花苞長1至2mm；時期III：花苞長2至5mm；及時期IV：花苞長5至10mm。於不同發育時期，花苞會表現不同的*PeMADS*基因；其中*PeMADS2*、*PeMADS3*及*PeMADS4*基因於時期II及III時表現，而*PeMADS5*基因則於時期IV時表現(參看圖6)，可知該等基因從花苞的早期發育時便表現，且一直持續至發育完成；但其他植物器官如花梗、苗芽、葉及根則不表現這些*PeMADS*基因。

在野生種蘭花的不同器官中，該等*PeMADS*基因的表現亦不相同(參看圖7a)：*PeMADS2*於花萼、花瓣中強烈表現，於蕊柱中表現較少，而於唇瓣及花粉塊中則完全不表現；*PeMADS3*於花瓣、唇瓣中強烈表現，於蕊柱中表現較少，而於花萼及花粉塊中則完全不表現；*PeMADS4*只於唇瓣及蕊柱中表現；及*PeMADS5*於花萼、花瓣及唇瓣中明顯表現，於蕊柱中則表現較少。

在本發明中，亦比較野生種及突變種蘭花中*PeMADS*基

## 五、發明說明 ( 11 )

因的表現。根據本發明，所使用之突變種(Christenson, E. A. (2001). *Phalaenopsis: a monograph*. Timber Press, Inc. The Haseltine Building, 133 S. W. Second Avenue, Suite 450, Portland, Oregon 97204, U. S. A.)(參看圖1b)具有三個花萼、三個類似唇瓣的花瓣、一個拱型的蕊柱、一個周圍縮小的花藥、及一個平坦的柱頭，但並不具雄蕊始原及花粉塊。在此突變種蘭花的不同器官中，該等*PeMADS*基因的表現如下(參看圖7b)：*PeMADS2*於花萼、類似唇瓣的花瓣、蕊柱中表現，而於唇瓣中則完全不表現；*PeMADS3*於類似唇瓣的花瓣、唇瓣及蕊柱中強烈表現，*PeMADS2*及*PeMADS3*於突變種之蕊柱中的表現皆明顯強於野生種中；*PeMADS4*於唇瓣及蕊柱中強烈表現，但於類似唇瓣的花瓣中亦有些微表現；與野生種最大不同的是，*PeMADS5*在突變種之花萼、類似唇瓣的花瓣、唇瓣及蕊柱全部不表現。由此結果可知*PeMADS4*的正向調控表現或是*PeMADS5*的負向調控表現皆對蘭花花瓣及唇瓣的型態有重大之影響。

根據本發明，在野生種中，*PeMADS2*與*PeMADS5*皆強烈表現於花萼及花瓣中，而*PeMADS3*與*PeMADS4*則皆不於花萼中表現，但突變種中，於花萼只有*PeMADS2*表現，因野生種及突變種中皆有花萼，故可知*PeMADS2*及其基因產物*PeMADS2*係調控花萼之發育，於蘭花或蘭花細胞中改變*PeMADS2*及其基因產物*PeMADS2*之量，即可控制花萼之發育。

## 五、發明說明 ( 12 )

根據本發明，在野生種中，*PeMADS3*與*PeMADS4*皆強烈表現於唇瓣中，而*PeMADS2*與*PeMADS5*則表現較弱，在突變種中，*PeMADS4*強烈表現於類似唇瓣的花瓣，故可知*PeMADS3*及*PeMADS4*與其基因產物*PeMADS3*及*PeMADS4*係調控唇瓣之發育，且*PeMADS4*及*PeMADS4*可特化唇瓣的形成，於蘭花或蘭花細胞中改變*PeMADS4*及其基因產物*PeMADS4*之量，即可控制唇瓣之發育。

根據本發明，在野生種中，全部的*PeMADS*基因皆不表現於花粉塊中，而*PeMADS4*於蕊柱中則較其他三者有明顯強烈的表現，故可知*PeMADS4*與其基因產物*PeMADS4*係調控蕊柱之發育，於蘭花或蘭花細胞中改變*PeMADS4*及其基因產物*PeMADS4*之量，即可控制蕊柱之發育，但該等*PeMADS*基因則皆不參與花粉塊的發育；再進一步比較野生種和突變種蕊柱中*PeMADS*的表現，其中*PeMADS2*與*PeMADS3*在突變種蕊柱中較於野生種中表現強烈，但*PeMADS5*則無法於蕊柱中偵測到表現，因突變種中缺乏雄蕊始原，故可知*PeMADS5*及其基因產物*PeMADS5*係用以調控雄蕊始原的發育，於蘭花或蘭花細胞中改變*PeMADS5*及其基因產物*PeMADS5*之量，即可控制雄蕊始原之發育。

根據本發明，在野生種中，除了*PeMADS4*外，於花瓣中皆有表現，故可知*PeMADS4*與花瓣的發育無關，但在突變種中，*PeMADS5*的表現無法偵測到，而突變種中花瓣亦突變成類似唇瓣的形狀，故可知*PeMADS5*與其基因產物



## 五、發明說明 ( 13 )

PeMADS5係可調控花瓣之發育，於蘭花或蘭花細胞中改變*PeMADS5*及其基因產物PeMADS5之量，即可控制花瓣之發育。

根據本發明，可於蘭花中控制花發育蛋白質之核酸分子係選自由*PeMADS2*、*PeMADS3*、*PeMADS4*、*PeMADS5*、其反轉錄股及其簡併序列所組成之群。本文所使用之「反轉錄股」一詞係指可與*PeMADS*基因之RNA轉錄物雜合之核酸分子，較佳係可與*PeMADS*基因之RNA轉錄物鹼基配對之核酸分子，此雜合係於植物細胞之生理環境或其等效環境中發生，其包含於細胞核中或於細胞質中，或於體外環境中，熟習該項技術之人士可決定雜合反應之條件，其中體外雜合之條件範圍較佳係自約於52°C之5倍沙林溶液-檸檬酸鈉(SSC, Saline-Sodium Citrate)中至於65°C之約0.1倍SSC中進行。此外，本文所使用之「簡併序列」一詞係指除*PeMADS*外，亦可編碼*PeMADS*基因蛋白質產物(即PeMADS蛋白質)之核酸序列。

本發明另提供包含可於蘭花中控制花發育核酸分子之載體。該載體可用於保存、生產該核酸分子，或用於將該核酸分子導入一植物體或一植物細胞中；較佳地，該載體係為一穿梭載體(shuttle vector)。本文所使用之「穿梭載體」一詞係指可同時於植物中及便於複製之細胞(通常為原核生物)中操作及選擇之載體。通常該穿梭載體包含可選擇之標記，如可於植物細胞中選擇之抗康納黴素(kanamycin)標記或可於原核生物中選擇之抗放線菌素(actinomycin)

## 五、發明說明( 14 )

標記。此外，該載體亦包含可於原核生物中複製之起始點(origin)及可用於基因操作之限制酵素位置。較佳地，根據本發明之核酸分子係受一啟動子控制，更佳地，該啟動子係可於植物之生殖組織或器官中驅動基因的表現，如花椰菜鑲嵌病毒35S蛋白質啟動子(cauliflower mosaic virus 35S protein promoter)、 $\alpha$ -1及 $\beta$ -1微管蛋白(tubulin)啟動子及組織蛋白(histone)啟動子。在本發明之一些具體實施例中，該啟動子為可誘導之啟動子，其包含但不限於熱休克蛋白啟動子、包含葉綠素a/b光之光驅動啟動子。熟習該項技藝人士根據本發明的教示，即可完成該等載體的構築。

另一方面，本發明提供一種包含可於蘭花中控制花發育核酸分子之載體之細胞，其係將該載體經轉型作用(transformation)導入一細胞中而得，該細胞可為原核細胞或蘭科植物細胞，較佳係為細菌或蝴蝶蘭細胞。本文中所使用之「轉型作用」一詞係指經由一核酸分子之導入，而改變一細胞中之遺傳物質。熟習該項技術之人士經由本發明之揭示及一般分子生物學之知識可完成此轉型作用，如將載體導入一細菌時可採用熱休克方式，將載體導入植物細胞時可採用基因槍(gene gun)方式進行。

本發明再提供一種製造蘭科植物轉型細胞之方法，其係將可於蘭花中改變花發育之核酸分子導引至一蘭科植物細胞中，以獲得該蘭科植物轉型細胞。

另一方面，本發明亦提供一種套組，包含可於蘭花中改

## 五、發明說明 ( 15 )

變花發育核酸分子之載體。該套組為便於操作，可另包含轉型作用中所需之緩衝液。

本發明另關於一種製造蘭科轉殖植物之方法，其步驟包含：

(a) 將可於蘭花中改變花發育之核酸分子導引至一蘭科植物細胞以獲得一蘭科植物轉型細胞；及

(b) 自步驟(a)中之蘭科植物轉型細胞再生製造該蘭科轉殖植物。

於蘭科植物中，製造轉殖植物通常以一擬原球體(protocorn-like body)進行，在蘭科植物營養體誘導或無菌播種時會經過擬原球體這個階段，其係為具分化能力、增生能力強且增殖速率快之組織，擬原球體中之個別細胞經分離後，可再發育成一新擬原球體進而發育成一植株。於步驟(a)中，可將該核酸分子導入該擬原球體中，較佳係以基因槍方式進行，此時核酸分子已導入擬原球體中之某些細胞形成轉型細胞，但某些細胞則未被導入，可經由載體上之選擇標記選殖已導入之細胞，再進行步驟(b)將該轉型細胞再生為該轉殖植物。本文中所使用之「再生」一詞係指自一植物細胞、一群植物細胞或植物的一部份成長為一植物，此再生之方法為熟習此項技藝者所熟知。

本發明再提供一種於蘭花中控制花發育之方法，其係改變一蘭科植物體內可控制花發育之蛋白質表現量，以控制花發育而改變花型，該蛋白質係選自由PeMADS2、PeMADS3、PeMADS4及PeMADS5所組成之群；根據本

## 五、發明說明 ( 16 )

發明，其係包含增加、減少或去除該蛋白質表現量，其改變之方法包含於該植物之至少一細胞內增加或減少編碼該蛋白質之核酸分子之套數，如導引 *PeMADS2*、*PeMADS3*、*PeMADS4*、*PeMADS5* 及其簡併序列之核酸分子至該植物體內以增加套數，或導引 *PeMADS2*、*PeMADS3*、*PeMADS4*、*PeMADS5* 之反轉錄股核酸分子至該植物之至少一細胞內以減少套數。於本文中所使用之「改變花型」一詞係指當與其親代植株相比時，於子代植株之生殖組織或器官結構上具有物理上之變形(modification)，亦即具有變形之表型(phenotype)，若該具有此種變形表型之植株係由一轉型細胞再生而成，則該植株所有細胞具有相同的遺傳物質，通常稱此種植株為轉殖植物；若一植株只有部分細胞(如僅有生殖細胞或組織)被轉型，僅有該被轉型之細胞表現出與其親代不同的表型，此通常稱為鑲嵌植物(mosaic plant)，其可自親代取出欲轉型之細胞進行轉型作用。

本發明適用於蘭科之植物及細胞，較佳係應用於蝴蝶蘭及其細胞中。根據本發明，其中親代植株包含野生種之蘭科植物及以人工方法製造之突變種，該人工方法包含如化學物質或 X-射線誘發之隨意突變(random mutagenesis)或利用重組技術修飾植物之遺傳物質。

茲以下列實例予以詳細說明本發明，惟並不意味本發明僅侷限於此等實例所揭示之內容。

實例

## 五、發明說明 ( 17 )

### 植物材料及RNA製備：

具有紅色花瓣、橘色唇瓣之野生種(參看圖1a)，及具有類似唇瓣的花瓣、拱型蕊柱、一個周圍縮小的花藥、及一個平坦的柱頭，而並不具雄蕊始原及花粉塊之突變種(參看圖1b)桃紅蝴蝶蘭(*P. equestris*)係栽植於台灣糖業研究中心之溫室中，並以自然光照射且控制生長溫度為自23°C至27°C。

自根、葉、苗芽、時期I至IV之花苞(參看圖1c)及時期IV之花萼、花瓣、唇瓣、花粉塊與蕊柱中，依O'Neill等人描述的方法萃取全部RNA(O'Neill, S. D. 等人(1993). Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination. Plant Cell 5, 419-32.)，並浸於液態氮裡，於-80 °C中保存。

### cDNA資料庫構築：

以聚(A)快速RNA分離套組(Stratagene, La Jolla, CA)自時期IV之桃紅蝴蝶蘭花苞中製備聚(A)<sup>+</sup> mRNA。cDNA的合成、分子大小的選擇、連接子的加入、連接作用及包裹入λ載體之方法係依操作指示進行(λZAPII, Stratagene)，全部cDNA資料庫的力價為 $1.1 \times 10^6$  pfu/ml。接著依操作手冊(Stratagene)所示之質量刪除法，將此噬菌體資料庫轉換為質體形式。將所得之噬菌質體(phagemid)資料庫塗盤於包含25 mg/l 康納黴素之低密度Luria Bertani凝膠培養基中。自cDNA資料庫隨機選取超過4000個細菌菌落，並接著進行質體分離、序列分析，

## 五、發明說明 ( 18 )

並長時間保存於微力價(microtiter)盤中。

利用鹼性溶菌之標準操作(Sambrook, J.等人(2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)自大腸桿菌(*E. coli*)中分離DNA質體，並經抽氣過濾及高輸出量96井格式之陰離子交換層析管柱(Qiagen, Ontario, Canada)處理。全部的定序反應以標準T3定序引子進行，並解讀至每段cDNA之假定5'端。自動化循環定序DNA係以具染劑標示之終結子(terminators)進行，並於丙烯醯胺凝膠上電泳分析(ABI 377, Applied Biosystems, Foster City, CA)。

### 序列資料分析：

以電腦程式(Sequencher 4.1, GeneCode, Ann Arbor, MI)編輯原始DNA序列資料以移除載體序列、聚A序列、及品質欠佳之資料，並再以人工方式與電泳圖核對，並再次編輯以提高品質及資料的信賴度。每個編輯完之EST以全部六個閱讀框構(reading frames)轉譯，並以BLASTX程式(Altschul, S. F.等人(1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402)與國立生物技術資訊中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)之非重複性資料庫比對，其中使用預設之BLAST參數。無顯著相似之序列則

## 五、發明說明 ( 19 )

以BLASTN (Altschul等人, 1997)再度比對。

5'快速放大*PeMADS* cDNA端反應：

利用SMART RACE cDNA放大套組(Clontech, Palo Alto, CA)延長cDNA之5'端進行快速放大cDNA端反應(Rapid amplification of cDNA ends, RACE)以獲得cDNA全長。以5' RACE之操作手冊指示,自時期IV花苞之400 ng全部RNA合成第一股cDNAs,再以5'特異通用引子(Clontech)及不同*PeMADS*基因之3'基因特異引子,利用聚合酵素鏈鎖反應(PCR)放大包含*PeMADS*的5'端之複製Cdna,其中*PeMADS2*的基因特異引子為5'-TCTCTCTGAATAGATCC CCCATCTC-3';*PeMADS3*的基因特異引子為5'-GCAGTGCTAGACCCTACTTGTAAGC-3';*PeMADS4*的基因特異引子為5'-GCTATATCCCGTTCCTTGAAGATTTTG-3';及*PeMADS5*的基因特異引子為5'-TCCTATGATGTTAAGCCATGAAAAC-3',所使用之熱循環為起始變性94°C5秒;接著25個循環之94°C30秒、65°C30秒及72°C2分鐘;及最後延長72°C5分鐘。RACE之產物接著再以*PeMADS*套疊(nested)基因特異引子及RACE套組中提供之套疊通用引子放大,其中*PeMADS2*之套疊基因特異引子為5'-TGATTTCGGATGAACAACCCTA-3';*PeMADS3*之套疊基因特異引子為5'-AGGAAGCCCCATT TCCAAGTG-3';*PeMADS4*之套疊基因特異引子為5'-

## 五、發明說明( 20 )

GTGCATTAAGTTCCGGTGTGT-3'；及 *PeMADS5* 之套疊基因特異引子為 5'-TGCACATTTGGC TCACTCCGG-3'。所使用之 PCR 為起始變性 94°C 5 分鐘；接著 30 個循環之 94°C 30 秒、60°C 2 分鐘及 72°C 2 分鐘；及最後延長 72°C 5 分鐘。所完成之 PCR 產物接著複製到 pGEM-T 容易載體 (pGEM-T Easy vector, Promega, Madison, WI)，並定序十個正向複製 DNA 之兩股。

序列及演化樹構築：

由推定而得胺基酸序列之配對排列 (alignments) 係以 GCG 包裹之 GAP 程式進行 (Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys Inc., San Diego, CA)，其係以預設參數之缺口重 8 及長 2 進行。多重排列則使用同一包裹中之 PILEUP 程式 (Wisconsin Package Version 10.3) 以同樣參數進行。其結果示於圖 2 及圖 3。且參看下表 1，其顯示阿拉伯芥、水稻、玉米、百合及蘭花中類 DEF 蛋白質 MADS-box 區域及蛋白質全長之胺基酸相同及相似度，其中 a 表示 MADS-box 區域之相同度；b 表示類 DEF 蛋白質全長之相同度；c 表示 MADS-box 區域之相似度；及 d 表示類 DEF 蛋白質全長之相似度。

表 1：

	AP3	OSMADS16	SILKY1	LMADS1	PeMADS2	PeMADS3	PeMADS4	PeMADS5
AP3	—	75.0 <sup>a</sup> /48.9 <sup>b</sup>	76.7/51.1	73.3/51.8	75.0/48.2	71.7/48.6	73.3/49.1	70.0/47.7
OSMADS16	80.0 <sup>c</sup>	—	98.3/90.5	81.7/69.8	80.0/60.8	80.0/65.2	81.7/63.5	76.7/54.4



## 五、發明說明 ( 21 )

	55.7 <sup>d</sup>							
SILKY1	81.7/	98.3/93.7	—	93.3/69.6	81.7/60.3	81.7/66.7	83.3/65.0	78.3/51.1
	58.0							
LMADS1	83.3/	88.3/76.6	90.0/75.4	—	85.0/66.2	85.0/78.0	86.7/76.3	80.0/58.3
	61.4							
PeMADS2	83.3/	90.0/71.2	91.7/71.4	93.3/78.2	—	86.7/64.0	86.7/67.0	86.7/68.3
	60.5							
PeMADS3	80.0/	88.3/73.3	90.0/73.9	88.3/85.6	91.7/75.2	—	91.7/80.6	83.3/60.3
	57.8							
PeMADS4	81.7/	91.7/73.9	93.3/74.0	91.7/86.2	95.0/78.1	96.7/87.4	—	80.0/58.3
	60.5							
PeMADS5	80.0/	81.7/63.7	83.3/60.3	85.0/69.3	90.0/75.7	88.3/71.5	86.7/69.4	—
	61.2							

可知此 PeMADS 蛋白質皆具有獨特的 MIKC 型區域結構，*PeMADS* 為類 *DEF* 之 MADS 基因。

用於系統發育分析之序列包含 MADS-box 區域加上自 MADS-box 區域下游之 110 個胺基酸 (Purugganan, M. D. 等人 (1995). Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. Genetics 140, 345-356)。以鄰近參與法構築及啟動分析以求出系統發育樹 (Münster 等人, 1997)，其結果示於圖 4，可知此四蛋白質皆屬於單子葉之 B 基因之類 *DEF* 蛋白質，其中 *PeMADS2/PeMADS5* 及 *PeMADS3/PeMADS4* 應分別演化自兩同源之蛋白質，再經基因複製產生四個基因。

#### 基因體 DNA 分離及南方墨點分析：

基因體 DNA 分離法係依 Carlson 等人 (1991) 方式進行

## 五、發明說明 ( 22 )

(Carlson, L. E. 等人(1991). Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. Theor. Appl. Genet. 83, 194-200)。此基因體DNA樣品接著以 *Bgl* II、*Eco* RI及*Hind* III限制酵素處理，並以0.8%之瓊脂糖凝膠解析，再以抽氣移轉系統(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)移轉至耐龍濾紙上(Amersham Pharmacia Biotech)。其中相似度高之MADS-box區域及大部分之K區域被摒除在探針外，以防交叉雜交的發生。*PeMADS2*特異探針(295 bp)係以 *PeMADS2* 特異內部引子 5'-GAAACTTACCGCGCTCTA-3' 及 5'-TCTCTCTGAATAG ATCCCCCATCTC -3' 以PCR放大；*PeMADS3*特異探針(284 bp)係以 *PeMADS3*特異內部引子 5'-CTCTCAAGAAACCCACAG-3' 及 5'-GCAGTGCTAGACC CTA CTTGTAAGC-3' 放大；*PeMADS4*特異探針(296 bp)係以 *PeMADS4*特異內部引子 5'-GAGGACCACCCAGTGTA T-3' 及 5'-CACAGAATCACACATAGCA-3' 放大；及 *PeMADS5*特異探針(289 bp)係以 *PeMADS5*特異內部引子 5'-CAAACAGACACTTGCAG G-3' 及 5'-TCCTATGATGTTAAGCCATGAAAAC-3' 放大。南方墨點分析係以由<sup>32</sup>P標示之探針雜交而得，且預雜交及雜交之條件為依一般操作進行(Sambrook等人，2001)。其結果示於圖5，可知 *PeMADS2*、*PeMADS4*及*PeMADS5*於桃

## 五、發明說明 ( 23 )

紅蝴蝶蘭之基因體中各具有一單一複本，而 *PeMADS3* 則具有兩個複本。

### RNA 墨點分析：

北方墨點分析雜交中，自桃紅蝴蝶蘭的不同器官中製備 RNA，包含時期 I 至 IV 之花苞、花梗、苗芽、葉及根及花器官中之花萼、花瓣、唇瓣、花粉塊及蕊柱。10g 之全部 RNA 樣品以乙二醛變性，再以 1% 之瓊脂糖凝膠進行電泳，再移轉至耐龍濾紙 (Amersham Pharmacia Biotech) 上。此 RNA 點接著以上述之用於南方墨點分析之探針雜交，預雜交及雜交之條件為依一般操作 (Sambrook 等人，2001)，並以 45S rDNA 之部分片段探針 (由國立台灣大學植物學系高燕玉博士提供) 做為內部控制，而偵測得 28S rRNA 帶。*PeMADS* 基因於花苞發育時及於不同蘭花組織中之結果示於圖 6，其中 *PeMADS2*、*PeMADS3* 及 *PeMADS4* 基因於時期 II 及 III 時表現，而 *PeMADS5* 基因則於時期 IV 時表現，可知該等基因從花苞的早期發育時便表現，且一直持續至發育完成；但其他植物器官如花梗、苗芽、葉及根則不表現這些 *PeMADS* 基因；圖 7a 及 7b 則顯示 *PeMADS* 基因分別在野生種及突變種花的不同器官中之北方墨點分析結果，野生種中，*PeMADS2* 於花萼、花瓣中強烈表現，於蕊柱中表現較少，而於唇瓣及花粉塊中則完全不表現；*PeMADS3* 於花瓣、唇瓣中強烈表現，於蕊柱中表現較少，而於花萼及花粉塊中則完全不表現；*PeMADS4* 只於唇瓣及蕊柱中表現；及 *PeMADS5* 於花萼、花瓣及唇瓣中

## 五、發明說明 ( 24 )

明顯表現，於蕊柱中則表現較少；突變種中，*PeMADS3*於類似唇瓣的花瓣、唇瓣及蕊柱中強烈表現，*PeMADS2*及*PeMADS3*於突變種之蕊柱中的表現皆明顯強於野生種中；*PeMADS4*於唇瓣及蕊柱中強烈表現，但於類似唇瓣的花瓣中亦有些微表現；*PeMADS5*在突變種之花萼、類似唇瓣的花瓣、唇瓣及蕊柱全部不表現。

上述實施例僅為說明本發明之原理及其功效，而非限制本發明。因此，習於此技術之人士對上述實施例所做之修改及變化仍不違背本發明之精神。本發明之權利範圍應如後述之申請專利範圍所列。

## 六、申請專利範圍

1. 一種核酸分子，其可於蘭花中控制花發育，該核酸分子之序列係選自由 *PeMADS2*、*PeMADS3*、*PeMADS4*、*PeMADS5*、其反轉錄股及其簡併序列所組成之群；其中

*PeMADS2*之序列為：

```
ACGCGGGGATA GTAGAGGAAG AAGAAGAGAA GGGTTGAGAA CAGAGGAAAA CAGGGGAGAA
CAGGGGAAGA GAGAGATGGG GAGGGGGAAG ATAGAGATAA AAAAGATAGA GAATCCGACG
AACAGGCAAG TTACATATTC TAAGAGGAGA GTTGGGATAC TGAAGAAGGC CAAGGAGCTC
ACTGTTCTCT GTGATGCTCA GGTCTCTCTC ATCATGTTCT CAAGCACAGG AAAGTTGGCT
GATTACTGCA GCCCCCTCTAC TGATATTAAG GGGATATATG AGAGGTACCA GGTGTGACT
GGAATGGATC TATGGAATGC TCAGTATGAG AGGATGCAGA ATACGCTGAA GCATCTGAAT
GAGATTAACC AAAACCTGAG GAAGGAGATT AGGAGGAGGA AGGGGGAGGA ATTGGAGGGC
ATGGACATAA AGCAACTGCG CGGTCTTGAG CAAACTTTGG AAGAGTCTCT TAGAATTGTT
AGGCATAGAA AGTATCATGT GATCGCCACA CAAACTGACA CTTACAAGAA AAAGCTTAAA
AGCACAAGGG AAACCTTACCG CGCTCTAATA CATGAACTGG ATATGAAAGA GGAGAATCCG
AACTACGGTT TTAATGTAGA AAACCAGAGT AGAATTTATG AAAATTCGAT TCCAATGGTG
AATGAGTGTC CTCAGATGTT TTCCTTTAGG GTTGTTCATC CGAATCAGCC CAATCTGCTT
GGTTTAGGTT ATGAATCACA TGATCTTAGC CTGTCATAAT GAGCAGTAAT ATTATGATTT
TATTGTATTT TTATTTTATG TTTGAACTT TAGAATTATG AGATGGGGGA TCTATTGAGA
GAGAACTGTC CTTTAATTTG ATTTTCCCGT TTGTTTCCTC TTCATGTCCA GTGAAATTTT
TTGTTTGTG TTTTCGG
```

*PeMADS3*之序列為：

```
ACGCCACAAC CCTTTGGCCA TTGCCTGCTA ATGGAAACCC AGCTGCCACT TTTTCCTTCC
CCAGCCTTAT ATACCTTCAG TTAATCTCTT CTGCCTCCAT TTTTATAAGC ATACTTTRCC
CCTTTTCTTT CCCATATCAA TCTCAACTCC TTCGCTTCTC CTGCTGCTTT GGGAAGCAGA
GCAAGAAAGA GAACCATGGG GAGGGGGAAG ATCGAGATAA AGAAGATTGA GAACCTTACA
AACAGGCAGG TTAATTAATC TAAGAGGAGG GCTGGGATCA TGAAAAAGGC GAGCGAGCTC
ACGGTCTCT GTGATGCTCA GCTCTCCCTT GTTATGTTCT CCAGCACCGG CAAGTTCTCC
GAGTATTGTA GTCCTACCAC CGATACCAAG AGTGTATATG ATCGTTACCA GCAGGTGTCC
GGCATAAATT TATGGAGCGA GCAGTACGAG AAGATGCAGA ATACGTTGAA TCATTTGAAG
GAGATAAACC ACAACTTGAG GAGGGAGATA AGGCAGAGGA TGGGCGAGGA TCTTGAAGGG
CTAGAAATCA AAGAACTGCG TGGTCTTGAG CAAAATATGG ACGAGGCCCT AAAGCTTGTA
AGGAATCGAA AGTATCACGT CATCAGCACC CAGACAGATA CATTCAAAAA AAAGTTGAAA
AACTCTCAAG AAACCCACAG GAACTTACTC CGGGAGCTGG AAAGTGAGCA CGCCGTCTAC
TACGTGGATG ATGATCCAAA CAACTATGAT GGCCTGCTTG CACTTGGAAG TGGGGCTTCC
TACTTGTATT CATTTCGTAC CCAACCAAGC CAGCCGAACC TTCAGGGAGT TGGATATGTC
CCTCATGATC TACGTCTCGC CTGATCTTTT ATTATCTGCA TGCCAAGTGC TTAATTATAT
CTATGTATCT GATGTTCTTA CGCTTACAAG TAGGGTCTAG CACTGCAATC GAATTCCTGC
GGCCGCCAGC GGCCGGACTC
```

*PeMADS4*之序列為：

```
ACGCGGGGCA CTGGCTTCAC TTTCTTCCCT GCGGCAATGG CCAACTATTC CCGGTAACCTA
TCGCTTTTGC GTTTCAGTT CTATAAAGG AATCCCCGCC AGAGCTTTTT CTTCTTATAG
AGCTTTCTTC CTCATCTCTC CCGTTCGTCA ACATCACTAA TCACTGCTGT TTCAGTAGAC
TGGGAGAGCT AGGAGTGGAG AAAAGAGATT TGAAGATGGG GAGGGGGAAG ATAGAGATTA
AGAAGATAGA GAATCCGACT AATCGGCAGG TGACCTACTC GAAGAGGAGA GCTGGGATTA
TGAAGAAGGC GAGGGAGATC ACTGTTCTCT GCGATGCTGA GGTTCGCTT ATCATGTTCT
CGAGTACTGG GAAGTTTTCT GAGTACTGTA GCCCTTCGAC GGAAACGAAG AAGGTTTTTG
```

## 六、申請專利範圍

AACGCTACCA GCAGGTATCT GGCATTAAC TGTGGAGCTC GCAGTACGAG AAGATGCTGA  
ATACGCTTAA CCATTCTGAAG GAGATCAATC GCAATCTGAG GAGGGAAGTA AGGCAGAGGA  
TGGGGGAAGA TCTTGAGGGA CTGGATATCA AGGAACTGCG CGGTCTTGAG CAAAACATTG  
ATGAGGCATT GAAGCTAGTA CGAAATAGAA AATATCATGT AATCAGTACT CAAACGGACA  
CCTACAAGAA GAAGTTGAAG AACTCCCAAG AAACACACCG GAACTTAATG CACGAATTGG  
AAATCGTTGA GGACCACCCA GTGTATGGGT TCCACGAGGA TTCAAGCAAT TATGAGGGTG  
TTCTTGCTCT TGCAAATGAC GGGTCTCACA TGTATGCCTT CCGGGTGCAA CCCAACCAAC  
AAAACTTCA AGGAACGGGA TATAGCTCTC ACGATCTTCG CCTCGCTTGA TATAATCGTG  
TAAGTAGTAC AATCACATAT GCAGTCTTCA TTTTATTGTT CGCAAATTAT GCTCTCAGTA  
GCTGGTATCT AATGTAGAAC TAACTACTGC AACTTGCTCT TATCTTGCTA TGTGTGATTC  
TGTGGTAATG TGGACT

### *PeMADS5* 之序列為：

TCGCAACACG AGGCGCTGTC GGCGAGTCGG GTTGTTTGGG AATGCAGCCC TAATCGGGCG  
GTAAATTCCG TCCAAGGCTA AATACGGGCG AGAGACCGAT AGCGAACAAG TACCGCGAGG  
GAATGGGGAG AGGGAAGATA GAGATAAAGA AGATAGAGAA TCCAACAAGC AGGCAAGTAA  
CGTATTCAAA GAGGCGACTT GGGATCATGA AGAAGGCAGA GGAATCACA GTGCTCTGCG  
ACGCTCAACT CTCACTCATC ATCTTCTCAA GCTCCGGCAA GTTAGCTGAT TTCTGCAGCC  
CTTCCACAGA CGTTAAAGAT ATAGTTGAGA GGTACCAAAA TGTTACCGGA ATTGATATAT  
GGGATGCGCA ATATCAGAGG ATGCAGAACA CTCTGAGGAA TCTCAGGGAG ATTAATCGTA  
ATCTTCAGAA GGAGATAAGA CAGAGGAAGG GGGAGAATCT GGAAGGGTTG GCGGTTAAAG  
AGCTGCGCGG TCTTGAGCAA AAATTGGAGG AGTCGGTTAA GATTGTTCCG CAGAGAAAGT  
ATCATGTGAT CGTACGCAA ACAGACACTT GCAGGAAAAA GCTCAAAAGC AGCAGACAAA  
TATACAGAGC CCTAACGCAT GAACTGCAGA AGCTGGACGA AGAGAATCAA CCGTGCAGTT  
TTCTCGTAGA AGATCTAAGC TGCATCTATG ACAGCTCAAT CTCAATGGCA AATCGGCTGC  
ACCGGAGTGA GCCAAATGTG CAGAAAGTAG TTCGTGAGTG TCATGAGTTT GGCTTTGATT  
GACCTGCAAT TTTCTATTAC TTTGTGTTAC AATGTGGATT TGTTTTCATG GCTTAACATC  
ATAGGATTGT ATAACTATT TTTTGTGTG CAATGTTTAA GTTCTGATCT TGATATCC

2. 根據申請專利範圍第1項之核酸分子，其係用以於蝴蝶蘭中控制花之發育。
3. 根據申請專利範圍第1項之核酸分子，其中 *PeMADS2* 係用於控制花萼之發育。
4. 根據申請專利範圍第1項之核酸分子，其中 *PeMADS3* 係用於控制唇瓣之發育。
5. 根據申請專利範圍第1項之核酸分子，其中 *PeMADS4* 係用於控制唇瓣及蕊柱之發育。
6. 根據申請專利範圍第1項之核酸分子，其中 *PeMADS5* 係用於控制花瓣及雄蕊之發育。
7. 一種載體，其載有如申請專利範圍第1至6項任何一項之核酸分子。

## 六、申請專利範圍

8. 根據申請專利範圍第7項之載體，其係可於植物體中表現之一穿梭載體。
9. 根據申請專利範圍第7項之載體，其包含一可誘導之啟動子。
10. 一種套組，其係用以於蘭花中控制花發育，其包含如申請專利範圍第7項之載體。
11. 根據申請專利範圍第10項之套組，其中該載體係可於植物體中表現之一穿梭載體。
12. 根據申請專利範圍第10項之套組，其中該載體包含一可誘導之啟動子。
13. 一種細胞，其包含如申請專利範圍第7項之載體。
14. 根據申請專利範圍第13項之細胞，其中該載體係可於植物體中表現之一穿梭載體。
15. 根據申請專利範圍第13項之細胞，其中包含一可誘導之啟動子。
16. 根據申請專利範圍第13項之細胞，其中該細胞為一原核細胞。
17. 根據申請專利範圍第13項之細胞，其中該細胞為一蘭科植物細胞。
18. 根據申請專利範圍第13項之細胞，其中該細胞為一蝴蝶蘭細胞。
19. 一種擬原球體(protocorn-like body)，其包含如申請專利範圍第1至6項任何一項之核酸分子。
20. 一種製造蘭科轉殖植物之方法，其步驟包含：

## 六、申請專利範圍

- (a) 將具如申請專利範圍第1至6項任何一項之核酸分子導引至一蘭科植物細胞以獲得一蘭科植物轉型細胞；及
- (b) 自步驟(a)中之蘭科植物轉型細胞再生製造該蘭科轉殖植物。
21. 根據申請專利範圍第20項之方法，其中該蘭科植物為蝴蝶蘭。
22. 根據申請專利範圍第20項之方法，其中該蘭科植物細胞係源自一擬原球體。
23. 根據申請專利範圍第20項之方法，其中步驟(a)係以一基因槍(gene gun)將該核酸分子導引至該蘭科植物細胞。
24. 一種製造蘭科植物轉型細胞之方法，其係將如申請專利範圍第1至6項任何一項之核酸分子導引至一蘭科植物細胞中，以獲得該蘭科植物轉型細胞。
25. 根據申請專利範圍第24項之方法，其中該蘭科植物細胞為衍生自蝴蝶蘭。
26. 根據申請專利範圍第24項之方法，其中該蘭科植物細胞係源自一擬原球體。
27. 根據申請專利範圍第24項之方法，其係以一基因槍(gene gun)將該核酸分子導引至該蘭科植物細胞。
28. 一種於蘭花中控制花發育之蛋白質，其係選自由PeMADS2、PeMADS3、PeMADS4、PeMADS5所組成之群，其中



## 六、申請專利範圍

### PeMADS2之序列為：

```

1   MGRGKIEIKK IENPTNRQVT YSKRRVGILK KAKELTVLCD AQLSLIMFSS
51  TGKLADYCSF STDIKGIYER YQVVTGMDLW NAQYERMONT LKHLNEINQN
101 LRKEIRRRXG EELEGMDIKQ LRGLEQTLLE SLRIVRHRKY HVIATQTDY
152 KKKLKSTRET YRALIHELDK KEENPNYGFN VENQSRIYEN SIPMVNECPQ
201 MFSFRVHPN QPNLLGLGYE SHDLSLA

```

### PeMADS3之序列為：

```

1   MGRGKIEIKK IENPTNRQVT YSKRRAGIMK KASELTVLCD AQLSLVMFSS
51  TGKFSYCSF TDTKSVYDR YQVSGINLW SEQYEQMONT LNHLKEINHN
101 LRREIRQRMG EDLEGLDIKE LRGLEQNMDE ALKLVRNRKY HVISTQTDY
152 KKKLKNSQET HRNLLRELET EHAYVYVDDD PNNDYGALAL GNGASYLYSF
201 RTQPSQPNLQ GVGYPHDLR LA

```

### PeMADS4之序列為：

```

1   MGRGKIEIKK IENPTNRQVT YSKRRAGIMK KAREITVLCD AEVSLIMFSS
51  TGKFSYCSF STETKKVFER YQVSGINLW SSQYEQMLNT LNHSKEINRN
101 LRREIRQRMG EDLEGLDIKE LRGLEQNIDE ALKLVRNRKY HVISTQTDY
152 KKKLKNSQET HRNLMHELEI VEDHPVYGFH EDSSNYEGLV ALANDGSHMY
201 AFRVQPNQNN LQGTGYSSHD LRLA

```

### PeMADS5之序列為：

```

1   MGRGKIEIKK IENPTSQVT YSKRRLGIMK KAEELTVLCD AQLSLIIFSS
51  SGKLADFCSP STDVKDIVER YQNVGTGDIW DAQYQRMONT LRNLREINRN
101 LQKEIRQRKG ENLEGLGVKE LRGLEQKLEE SVKIVRQRKY HVIATQTDTC
152 RKKLKSSRQI YRALTHELOK LDEENQPCSF LVEDLSCIYD SSISMANRLH
201 RSEPNVQKV RECHFGFD

```

29. 根據申請專利範圍第28項之蛋白質，其係用以於蝴蝶蘭中控制花之發育。
30. 根據申請專利範圍第28項之蛋白質，其中PeMADS2係用於控制花萼之發育。
31. 根據申請專利範圍第28項之蛋白質，其中PeMADS3係用於控制唇瓣之發育。
32. 根據申請專利範圍第28項之蛋白質，其中PeMADS4係用於控制唇瓣及蕊柱之發育。
33. 根據申請專利範圍第28項之蛋白質，其中PeMADS5係用於控制花瓣及雄蕊之發育。
34. 一種於蘭花中控制花發育之方法，其係改變一蘭科植

## 六、申請專利範圍

物體內如申請專利範圍第28至33項任何一項之蛋白質表現量，以控制花發育。

35. 根據申請專利範圍第34項之方法，其改變包含增加、減少及去除該蛋白質。

36. 根據申請專利範圍第34項之方法，其改變包含於該植物體之至少一細胞內增加或減少編碼該蛋白質之核酸分子之套數，其中該核酸分子之序列係選自由 *PeMADS2*、*PeMADS3*、*PeMADS4*、*PeMADS5*、及其簡併序列所組成之群；其中

*PeMADS2*之序列為：

ACGCGGGATA	G TAGAGGAAG	AAGAAGAGAA	GGGTTGAGAA	CAGAGGAAAA	CAGGGGAGAA
CAGGGGAAGA	GAGAGATGGG	GAGGGGGAAG	ATAGAGATAA	AAAAGATAGA	GAATCCGACG
AACAGGCAAG	TTACATATTC	TAAGAGGAGA	GTTGGGATAC	TGAAGAAGGC	CAAGGAGCTC
ACTGTTCTCT	GTGATGCTCA	GGTCTCTCTC	ATCATGTTCT	CAAGCACAGG	AAAGTTGGCT
GATTACTGCA	GCCCCCTCTAC	TGATATTAAG	GGGATATATG	AGAGGTACCA	GGTTGTGACT
GGAATGGATC	TATGGAATGC	TCAGTATGAG	AGGATGCAGA	ATACGCTGAA	GCATCTGAAT
GAGATTAACC	AAAACCTGAG	GAAGGAGATT	AGGAGGAGGA	AGGGGGAGGA	ATTGGAGGGC
ATGGACATAA	AGCAACTGCG	CGGTCTTGAG	CAAACCTTGG	AAGAGTCTCT	TAGAATTGTT
AGGCATAGAA	AGTATCATGT	GATCGCCACA	CAAACCTGACA	CTTACAAGAA	AAAGCTTAAA
AGCACAAAGG	AAACTTACCG	CGCTCTAATA	CATGAACTGG	ATATGAAAGA	GGAGAATCCG
AACTACGGTT	TTAATGTAGA	AAACCAGAGT	AGAATTTATG	AAAATTCGAT	TCCAATGGTG
AATGAGTGTC	CTCAGATGTT	TTCCTTTAGG	GTTGTTTCATC	CGAATCAGCC	CAATCTGCTT
GGTTTAGGTT	ATGAATCACA	TGATCTTAGC	CTTGCATAAT	GAGCAGTAAT	ATTATGATTT
TATTGTATTT	TTATTTTATG	TTTGAAACTT	TAGAATTATG	AGATGGGGGA	TCTATTGAGA
GAGAACTGTC	CTTTAATTTG	ATTTTCCCGT	TTGTTTCCTC	TTCATGTCCA	GTGAAATTTT
TTGTTTGTGTT	TTTTTCGG				

*PeMADS3*之序列為：

ACGCCACAAC	CCTTTGGCCA	TTGCCTGCTA	ATGGAAACCC	AGCTGCCACT	TTTTCTTCC
CCAGCCTTAT	ATACCTTCAG	TTACTCTCTT	CTGCCTCCAT	TTTTATAAGC	ATACTTTRCC
CCTTTTCTTT	CCCATATCAA	TCTCAACTCC	TTCGCTTCTC	CTGCTGCTTT	GGGAAGCAGA
GCAAGAAAGA	GAACCATGGG	GAGGGGGAAG	ATCGAGATAA	AGAAGATTGA	GAACCCTACA
AACAGGCAGG	TTACTTACTC	TAAGAGGAGG	GCTGGGATCA	TGAAAAAGGC	GAGCGAGCTC
ACGGTTCTCT	GTGATGCTCA	GCTCTCCCTT	GTTATGTTCT	CCAGCACCGG	CAAGTTCTCC
GAGTATTGTA	GTCCTACCAC	CGATACCAAG	AGTGTATATG	ATCGTTACCA	GCAGGTGTCC
GGCATAAATT	TATGGAGCGA	GCAGTACGAG	AAGATGCAGA	ATACGTTGAA	TCATTTGAAG
GAGATAAACC	ACAACCTGAG	GAGGGAGATA	AGGCAGAGGA	TGGGCGAGGA	TCTTGAAGGG
CTAGAAATCA	AAGAAGTGGG	TGGTCTTGAG	CAAAATATGG	ACGAGGCCCT	AAAGCTTGTA
AGGAATCGAA	AGTATCACGT	CATCAGCACC	CAGACAGATA	CATTCAAAAA	AAAGTTGAAA
AACTCTCAAG	AAACCCACAG	GAACCTTACTC	CGGGAGCTGG	AAACTGAGCA	CGCCGTCTAC
TACGTGGATG	ATGATCCAAA	CAACTATGAT	GGCGCGCTTG	CACTTGGAAG	TGGGGCTTCC
TACTTGTATT	CATTTTCGTAC	CCAACCAAGC	CAGCCGAACC	TTCAGGGAGT	TGGATATGTC
CCTCATGATC	TACGTCTCGC	CTGATCTTTT	ATTATCTGCA	TGCCAACTGC	TTAATTATAT

## 六、申請專利範圍

CTATGTATCT GATGTTCTTA CGTTACAAG TAGGGTCTAG CACTGCAATC GAATTCCCGC  
GGCCGCCAGC GGCCGGACTC

*PeMADS4* 之序列為：

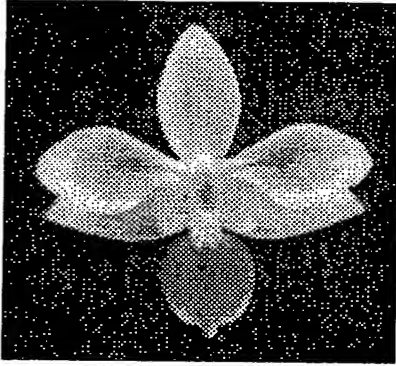
ACGCGGGGCA CTGGCTTCAC TTTCTTCCCT GCGGCAATGG CCAACTATTC CCGGTAACATA  
TCGCTTTTGC GTTTCAGTT CTATAAAGG AATCCCCGCC AGAGCTTTTTT CTTCTTATAG  
AGCTTTCTTC CTCATCTCTC CCGTTCGTCA ACATCACTAA TCACTGCTGT TTCAGTAGAC  
TGGGAGAGCT AGGAGTGGAG AAAAGAGATT TGAAGATGGG GAGGGGGAAG ATAGAGATTA  
AGAAGATAGA GAATCCGACT AATCGGCAGG TGACCTACTC GAAGAGGAGA GCTGGGATTA  
TGAAGAAGGC GAGGGAGATC ACTGTTCTCT GCGATGCTGA GGTTTCGCTT ATCATGTTCT  
CGAGTACTGG GAAGTTTTCT GAGTACTGTA GCCCTTCGAC GGAAACGAAG AAGGTTTTTG  
AACGCTACCA GCAGGTATCT GGCATTAAC TGTGGAGCTC GCAGTACGAG AAGATGCTGA  
ATACGCTTAA CCATTGGAAG GAGATCAATC GCAATCTGAG GAGGGAAGTA AGGCAGAGGA  
TGGGGGAAGA TCTTGAGGGA CTGGATATCA AGGAACTGCG CCGTCTTGAG CAAAACATTG  
ATGAGGCATT GAAGCTAGTA CGAAATAGAA AATATCATGT AATCAGTACT CAAACGGACA  
CCTACAAGAA GAAGTTGAAG AACTCCCAAG AAACACACCG GAACTTAATG CACGAATTGG  
AAATCGTTGA GGACCACCCA GTGTATGGGT TCCACGAGGA TTCAAGCAAT TATGAGGGTG  
TTCTTGCTCT TGCAAATGAC GGGTCTCACA TGTATGCCTT CCGGGTGCAA CCCAACCAAC  
AAAACTTCA AGGAACGGGA TATAGCTCTC ACGATCTTCG CCTCGCTTGA TATAATCGTG  
TAAGTAGTAC AATCACATAT GCAGTCTTCA TTTTATTGTT CGCAAATTAT GCTCTCAGTA  
GCTGGTATCT AATGTAGAAC TAACTACTGC AACTTGCTCT TATCTTGCTA TGTGTGATTC  
TGTGGTAATG TGGACT

*PeMADS5* 之序列為：

TCGCAACACG AGGCGCTGTC GGCGAGTCGG GTTGTTTGGG AATGCAGCCC TAATCGGGCG  
GTAATTTCCG TCCAAGGCTA AATACGGGCG AGAGACCGAT AGCGAACAAG TACCGCGAGG  
GAATGGGGAG AGGGAAGATA GAGATAAAGA AGATAGAGAA TCCAACAAGC AGGCAAGTAA  
CGTATTCAAA GAGGCGACTT GGGATCATGA AGAAGGCAGA GGAACCTACA GTGCTCTGCG  
ACGCTCAACT CTCACTCATC ATCTTCTCAA GCTCCGGCAA GTTAGCTGAT TTCTGCAGCC  
CTTCCACAGA CGTTAAAGAT ATAGTTGAGA GGTACCAAAA TGTTACCGGA ATTGATATAT  
GGGATGCGCA ATATCAGAGG ATGCAGAACA CTCTGAGGAA TCTCAGGGAG ATTAATCGTA  
ATCTTCAGAA GGAGATAAGA CAGAGGAAGG GGGAGAATCT GGAAGGGTTG GGCGTTAAAG  
AGCTGCGCGG TCTTGAGCAA AAATTGGAGG AGTCGGTTAA GATTGTTTCG CAGAGAAAGT  
ATCATGTGAT CGCTACGCAA ACAGACACTT GCAGGAAAAA GCTCAAAAGC AGCAGACAAA  
TATACAGAGC CCTAACGCAT GAACTGCAGA AGCTGGACGA AGAGAATCAA CCGTGCAGTT  
TTCTCGTAGA AGATCTAAGC TGCATCTATG ACAGCTCAAT CTCAATGGCA AATCGGCTGC  
ACCGGAGTGA GCCAAATGTG CAGAAAGTAG TTCGTGAGTG TCATGAGTTT GGCTTTGATT  
GACCTGCAAT TTTCTATTAC TTTGTGTTAC AATGTGGATT TGTTTTCATG GCTTAACATC  
ATAGGATTGT ATAACTATT TTTTGTGTG CAATGTTTAA GTTCTGATCT TGATATCC

37. 根據申請專利範圍第36項之方法，其係以一基因槍將該核酸分子導引至該細胞。
38. 根據申請專利範圍第36項之方法，其中該細胞係源自一擬原球體。
39. 根據申請專利範圍第36項之方法，其改變包含導引該核酸分子之反轉譯股(anti-sense strand)於該細胞內。

a



b



c

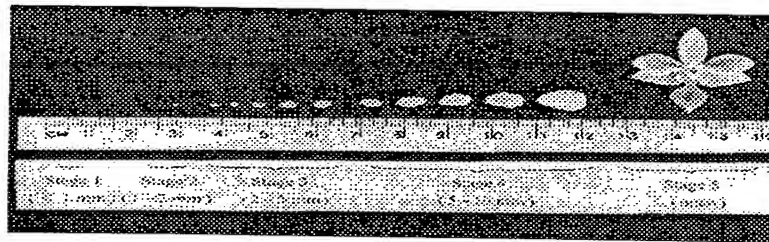


圖 1

MADS-DOMAIN

PI	MGRGKIEIKR	IENANNRVVT	SKRRNGVKK	KARELVLCDE	AVGLIFSS	NGKLSYCCPP	60
OSMADS4	MGRGKIEIKR	IENSTNRQVVT	SKRRNGVKK	KARELVLCDE	AVGLIFSS	AGKLSYCCPP	60
DEF	MGRGKIEIKR	IENQTNRQVVT	SKRRNGVKK	KARELVLCDE	AVGLIFSS	AGKLSYCCPP	60
AP3	MGRGKIEIKR	IENQTNRQVVT	SKRRNGVKK	KARELVLCDE	AVGLIFSS	AGKLSYCCPP	60
OSMADS16	MGRGKIEIKR	IENQTNRQVVT	SKRRNGVKK	KARELVLCDE	AVGLIFSS	AGKLSYCCPP	60
SILKY1	MGRGKIEIKR	IENQTNRQVVT	SKRRNGVKK	KARELVLCDE	AVGLIFSS	AGKLSYCCPP	60
PeMADS4	MGRGKIEIKR	IENQTNRQVVT	SKRRNGVKK	KARELVLCDE	AVGLIFSS	AGKLSYCCPP	60
PeMADS3	MGRGKIEIKR	IENQTNRQVVT	SKRRNGVKK	KARELVLCDE	AVGLIFSS	AGKLSYCCPP	60
LMADS1	MGRGKIEIKR	IENQTNRQVVT	SKRRNGVKK	KARELVLCDE	AVGLIFSS	AGKLSYCCPP	60
PeMADS2	MGRGKIEIKR	IENQTNRQVVT	SKRRNGVKK	KARELVLCDE	AVGLIFSS	AGKLSYCCPP	60
PeMADS5	MGRGKIEIKR	IENQTNRQVVT	SKRRNGVKK	KARELVLCDE	AVGLIFSS	AGKLSYCCPP	60

I-DOMAIN

PI	SMELCALD	YQLESGKLLW	DAKKNEN	SNE	DRNRKENDN	LCLEIRHMKKG	EDLQSLQPKN	120
OSMADS4	SMELCALD	YQLESGKLLW	DAKKNEN	SNE	DRNRKENDN	LCLEIRHMKKG	EDLQSLQPKN	120
DEF	SMELCALD	YQLESGKLLW	DAKKNEN	SNE	DRNRKENDN	LCLEIRHMKKG	EDLQSLQPKN	120
AP3	SMELCALD	YQLESGKLLW	DAKKNEN	SNE	DRNRKENDN	LCLEIRHMKKG	EDLQSLQPKN	120
OSMADS16	SMELCALD	YQLESGKLLW	DAKKNEN	SNE	DRNRKENDN	LCLEIRHMKKG	EDLQSLQPKN	120
SILKY1	SMELCALD	YQLESGKLLW	DAKKNEN	SNE	DRNRKENDN	LCLEIRHMKKG	EDLQSLQPKN	120
PeMADS4	SMELCALD	YQLESGKLLW	DAKKNEN	SNE	DRNRKENDN	LCLEIRHMKKG	EDLQSLQPKN	120
PeMADS3	SMELCALD	YQLESGKLLW	DAKKNEN	SNE	DRNRKENDN	LCLEIRHMKKG	EDLQSLQPKN	120
LMADS1	SMELCALD	YQLESGKLLW	DAKKNEN	SNE	DRNRKENDN	LCLEIRHMKKG	EDLQSLQPKN	120
PeMADS2	SMELCALD	YQLESGKLLW	DAKKNEN	SNE	DRNRKENDN	LCLEIRHMKKG	EDLQSLQPKN	120
PeMADS5	SMELCALD	YQLESGKLLW	DAKKNEN	SNE	DRNRKENDN	LCLEIRHMKKG	EDLQSLQPKN	120

K-DOMAIN

PI	MAVHAIRH	GLDKNRDHQM	EIRI	NEVMMAREE	QRQLTFPLOC	QEVAIASNAR	176
OSMADS4	MAVHAIRH	GLDKNRDHQM	EIRI	NEVMMAREE	QRQLTFPLOC	QEVAIASNAR	176
DEF	MAVHAIRH	GLDKNRDHQM	EIRI	NEVMMAREE	QRQLTFPLOC	QEVAIASNAR	176
AP3	MAVHAIRH	GLDKNRDHQM	EIRI	NEVMMAREE	QRQLTFPLOC	QEVAIASNAR	176
OSMADS16	MAVHAIRH	GLDKNRDHQM	EIRI	NEVMMAREE	QRQLTFPLOC	QEVAIASNAR	176
SILKY1	MAVHAIRH	GLDKNRDHQM	EIRI	NEVMMAREE	QRQLTFPLOC	QEVAIASNAR	176
PeMADS4	MAVHAIRH	GLDKNRDHQM	EIRI	NEVMMAREE	QRQLTFPLOC	QEVAIASNAR	176
PeMADS3	MAVHAIRH	GLDKNRDHQM	EIRI	NEVMMAREE	QRQLTFPLOC	QEVAIASNAR	176
LMADS1	MAVHAIRH	GLDKNRDHQM	EIRI	NEVMMAREE	QRQLTFPLOC	QEVAIASNAR	176
PeMADS2	MAVHAIRH	GLDKNRDHQM	EIRI	NEVMMAREE	QRQLTFPLOC	QEVAIASNAR	176
PeMADS5	MAVHAIRH	GLDKNRDHQM	EIRI	NEVMMAREE	QRQLTFPLOC	QEVAIASNAR	176

C-DOMAIN

PI	GMMLM.R	DG...Q	PAASMP...G	VQFLOPNLO	EKIMSLVID	---	208
OSMADS4	GMMLM.R	DG...Q	PAASMP...G	VQFLOPNLO	EKIMSLVID	---	210
DEF	GMMLM.R	DG...Q	PAASMP...G	VQFLOPNLO	EKIMSLVID	---	210
AP3	GMMLM.R	DG...Q	PAASMP...G	VQFLOPNLO	EKIMSLVID	---	210
OSMADS16	GMMLM.R	DG...Q	PAASMP...G	VQFLOPNLO	EKIMSLVID	---	210
SILKY1	GMMLM.R	DG...Q	PAASMP...G	VQFLOPNLO	EKIMSLVID	---	210
PeMADS4	GMMLM.R	DG...Q	PAASMP...G	VQFLOPNLO	EKIMSLVID	---	210
PeMADS3	GMMLM.R	DG...Q	PAASMP...G	VQFLOPNLO	EKIMSLVID	---	210
LMADS1	GMMLM.R	DG...Q	PAASMP...G	VQFLOPNLO	EKIMSLVID	---	210
PeMADS2	GMMLM.R	DG...Q	PAASMP...G	VQFLOPNLO	EKIMSLVID	---	210
PeMADS5	GMMLM.R	DG...Q	PAASMP...G	VQFLOPNLO	EKIMSLVID	---	210

圖 2

	PI Motif-Derived	PaleoAP3 Motif
DR6	--VHNIYAFR LQPL-HPNLQ	NE-GG-FGSR -DLRLS
OSMADS16	GAAADMFAFR VVPS-QPNLH	GMAYGGN--H -DLRLG
TAMADS51	GLAADMFAFR VVPS-QPNLH	GMAYGGS--H -DLRLG
SILKY1	GAPPDMYAFR VVPS-QPNLH	GMAYG-F--H -DLRLG
SmAP3	RPADVGYAFH HSAG-QSNVH	---DVGYGfH -ELRLA
PeMADS3	---SYLYSFR TQPS-QPNLQ	---GVGYVPH -DLRLA
PeMADS2	---PQMFSFR VVHPNQPNLL	---GLGYESH -DLRLA
PeMADS4	---SHHYAFR VQPN-QQNLQ	---GTGYSSH MDLRLA
LMADS1	NGASHLYEFR VQPS-QPNLH	---GMGYGSH -DLRLA
PnAP3-2	---PNIFAFR LQPS-QPNLH	N--GGGYNCH -DLRLA
MfAP3	---AHI-----LH	D---TGFGIH -DLRLA
DeAP3	---QNIFAFR LQPS-QPNLH	D--GGGYGSH -DLRLA
PeMADS5	YDSSISMANR LHRS-EPNVQ	---KVVRECH -EFGFD
CMB2	AAA-NLFALS RHPIT-----	-----
Consensus	-----F.FR LQPS.QPNLH	-----YG-H -DLRLA

圖 3

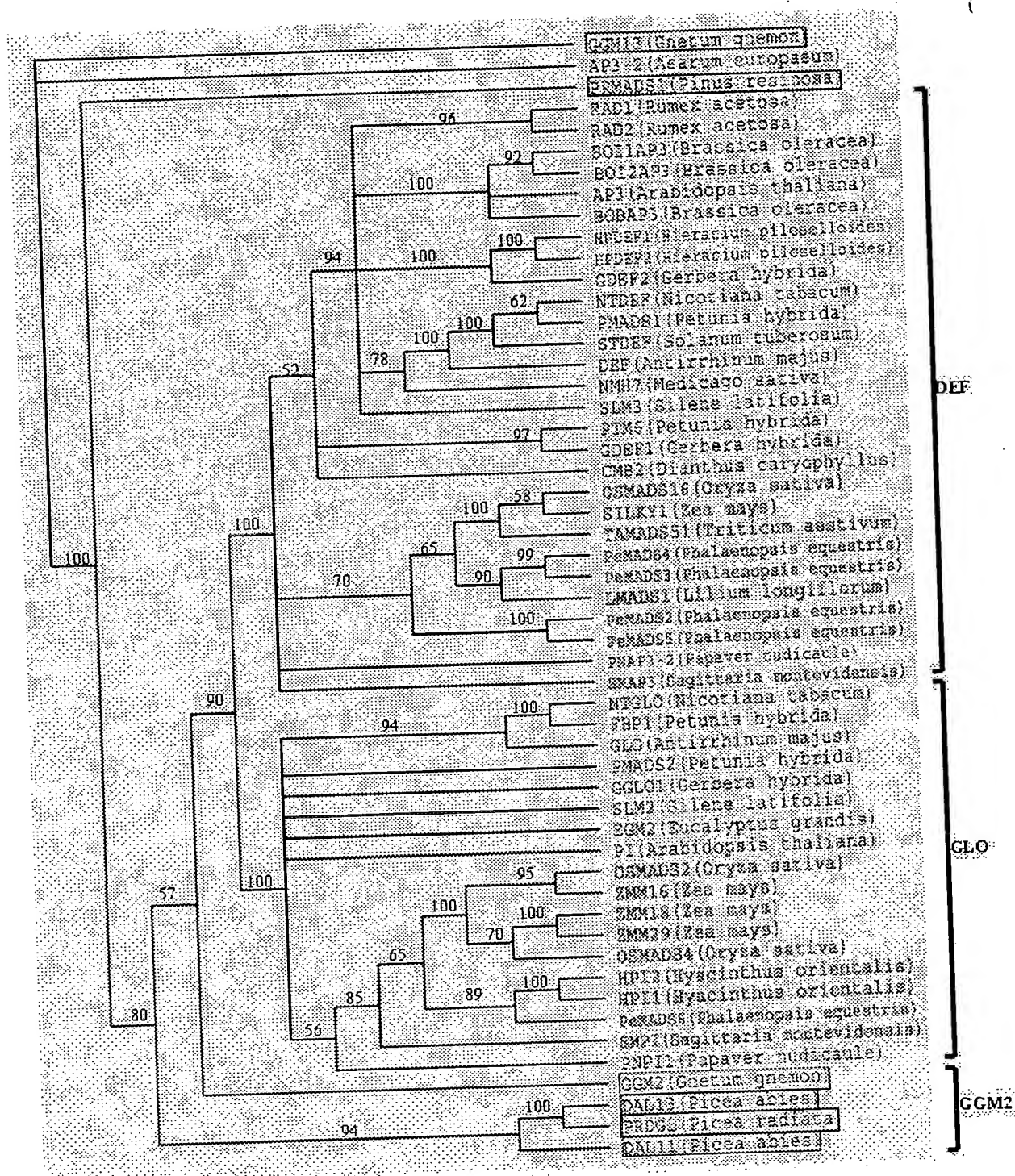


圖 4



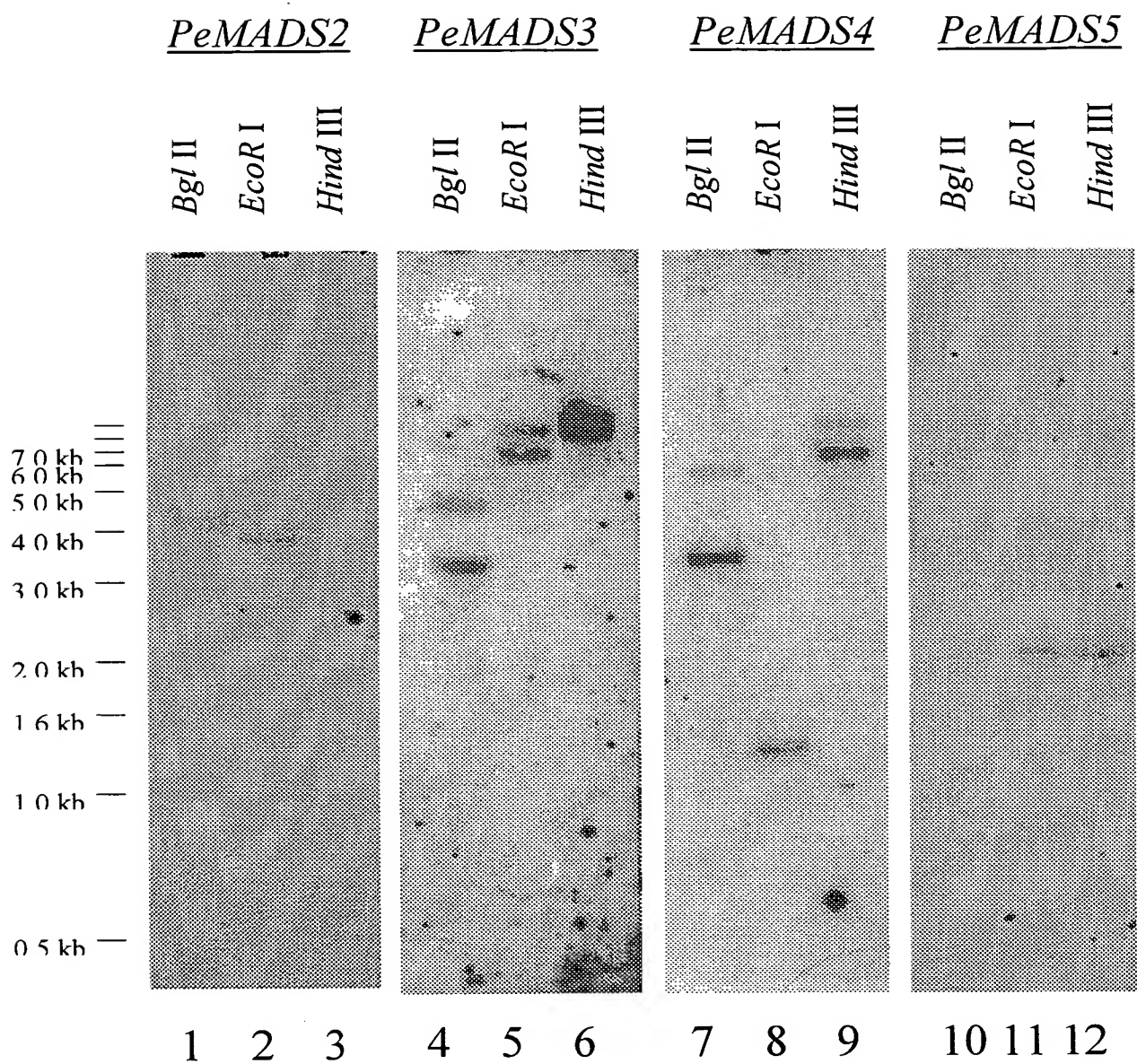


圖 5



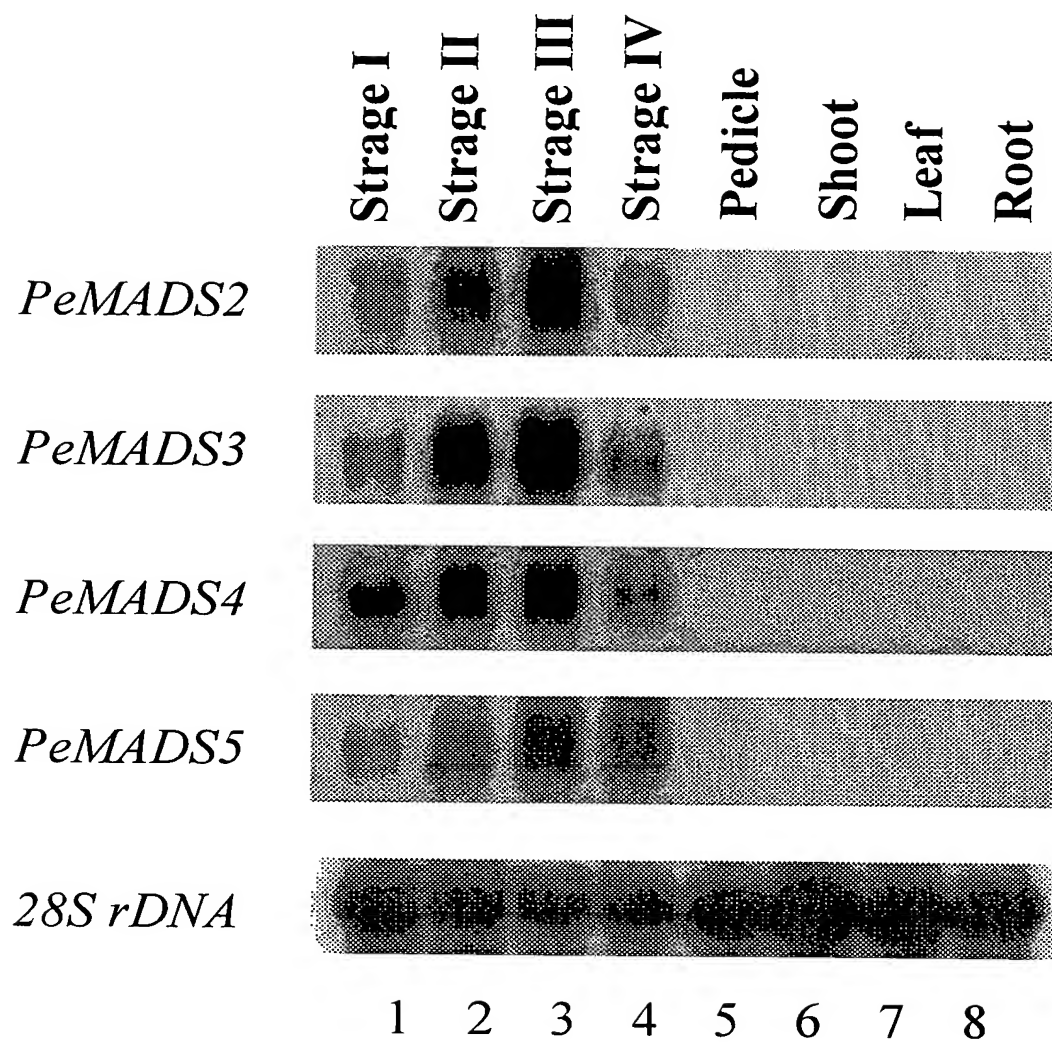


圖 6

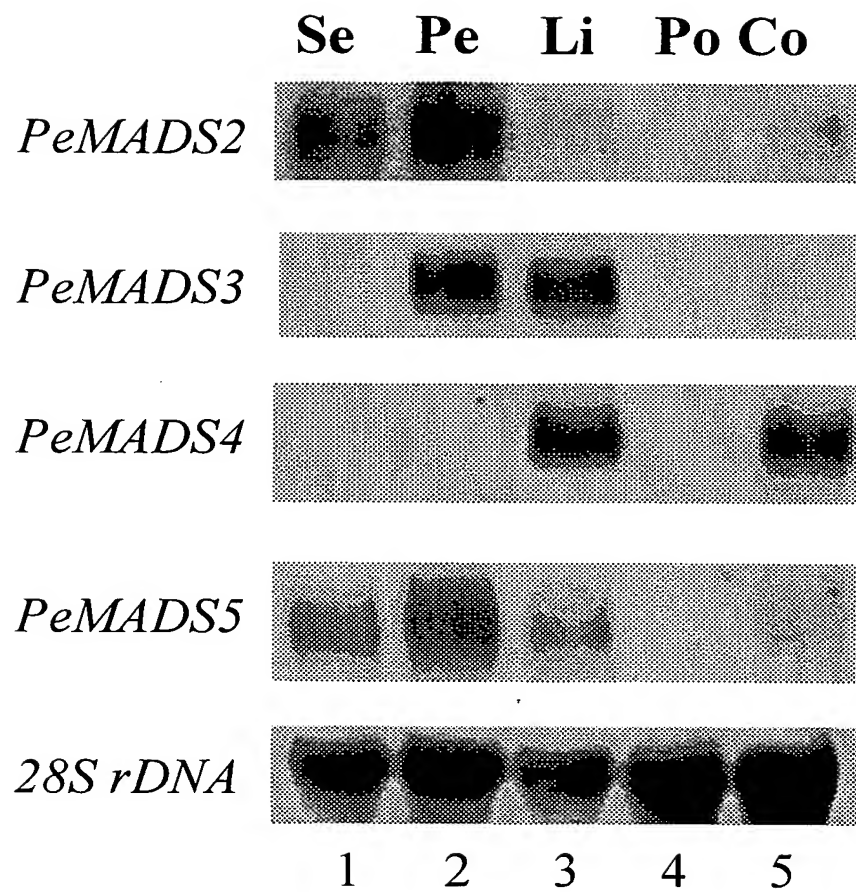


圖 7a

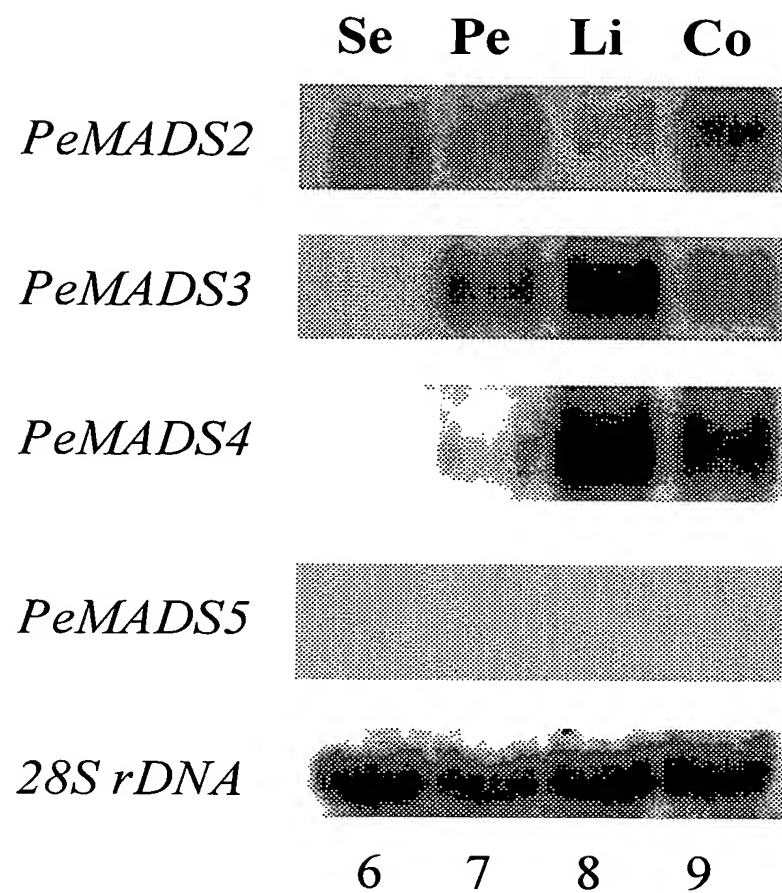


圖 7b